Annee 1973 N°

FACULTE DE MEDECINE DE PARIS

PITIE-SALPETRIERE

54

THESE

POUR LE

DOCTORAT EN MEDECINE

(Diplôme d'Etat)

PAR

Claude LEPAULT épouse DARTIGALONGUE

NEE LE 12 AVRIL 1946 AU RAINCY (93)

Presentée et soutenue publiquement le 1973

INTERET DU DOSAGE DES PHOSPHOLIPIDES DANS LES DIFFERENTS TYPES D'HYPERLIPIDEMIE

PRESIDENT : MONSIEUR LOEPER, PROFESSEUR.

Editions de l'A.G.E.M.P.
8, Rue Dante - PARIS Ve

Année 1973 N°

FACULTE DE MEDECINE DE PARIS

PITIE-SALPETRIERE

THESE

POUR LE

DOCTORAT EN MEDECINE

(Diplôme d'Etat)

PAR

Claude LEPAULT épouse DARTIGALONGUE

NEE LE 12 AVRIL 1946 AU RAINCY (93)

Présentée et soutenue publiquement le 1973

INTERET DU DOSAGE DES PHOSPHOLIPIDES DANS LES DIFFERENTS TYPES D'HYPERLIPIDEMIE

PRESIDENT : MONSIEUR LOEPER, PROFESSEUR.

Editions de l'A.G.E.M.P.

8, Rue Dante - PARIS Ve

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

A mon mari, A mon fils,

A mes parents,

A mes beaux parents,

A ma famille,

A mes amis.

A Monsieur le Professeur Jacques LOEPER,

qui nous a fait le très grand honneur d'accepter la présidence de cette thèse, qui nous a conseillé et donné les moyens de réaliser ce travail, qu'il trouve ici l'expression de notre reconnaissance respectueuse.

A Mademoiselle Jacqueline LOEPER,

pour sa précieuse collaboration technique.

A Monsieur RAMEIX,

pour son enseignement.

INTERET DU DOSAGE DES PHOSPHOLIPIDES

DANS LES DIFFERENTS TYPES D'HYPERLIPIDEMIE

-:-:-:-:-:-:-

P L A N

- HISTORIQUE

- ETUDE DU RAPPORT $\frac{\text{CHOLESTEROL}}{\text{PHOSPHOLIPIDES}}$ DANS LES DIFFERENTS TYPES D'HYPERLIPIDEMIES

  - classification
  - méthode de dosage utilisé
  - les résultats obtenus

- ETUDE DE LA REPARTITION DES PHOSPHOLIPIDES CHEZ LES MALADES ATTEINTS D'HYPERLIPIDEMIES

  - séparation par chromatographie après ultra centrifugation
  - résultats

- COMMENTAIRES

- CONCLUSION

Nous nous sommes proposés dans ce travail, d'étudier les phospholipides sériques dans les différents types d'hyperlipidémies.

Cette étude se subdivise en deux parties :

- dosage des phospholipides avec étude du rapport $\frac{\text{cholestérol}}{\text{phospholipides}}$ dans chacune des formes

- étude de la répartition des différents phospholipides pour chromatographie après ultra centrifugation.

C'est à CHEVREUIL, en 1823 que revient le mérite d'avoir le premier constaté l'existence dans le sang d'une matière grasse phosphorée et azotée s'émulsionnant avec l'eau.

HATTORI en 1929 étudie avec grand soin les propriétés physico-chimiques des mélanges de lécithine et de cholestérol. Il conclua que la lécithine et le cholestérol forment un système dans lequel le cholestérol est une phase dispersée dans le milieu de dispersion lécithine.

Si l'on fait agir de l'eau ou des solutions salines hypotoniques, la lécithine gonfle trop et sa consistance devient tellement faible, que le cholestérol s'en sépare sous forme de parcelles, qui s'animent de mouvements browniens.

MACHEBOEUF en 1928, fit une recherche sur les constituants lipidiques, les stérols, et les protéines du plasma sanguin. Par une longue série de fractionnement il a extrait du sérum et du plasma de chevaux normaux, une substance constituée par :

- un peu moins de 60 % de protéines
- près de 40 % de lipides (phospholipides et stérides)
- de petites quantités de cholestérol libre.

Il constate que, malgré cette très haute teneur en lipides, cette substance est très soluble dans l'eau. Cette solubilité dans l'eau est telle qu'il est possible d'obtenir des gelées parfaitement limpides contenant plus de 100 grammes de lipides par litre. Dans la substance ici extraite, l'albumine des phospholipides et les stérides ne sont pas à l'état libre, mais unis par des liaisons physiques ou chimiques suffisamment fortes pour modifier profondément les propriétés physiques des différents constituants, mais cependant non assez puissants pour résister à l'action d'agents énergiques tel l'alcool bouillant, qui est capable de les séparer. Il explique ainsi la limpidité de ce liquide par l'existence d'une telle combinaison.

AHRENS et KUNKEL, en 1949, constatent également l'existence de sérums clairs malgré une élévation nette des lipides totaux; inversement, des sérums laiteux se voient avec des lipides totaux augmentés. Leur étude démontre que les sérums à concentration élevée en lipides totaux, mais avec prédominance des phospholipides, sont toujours clairs; de plus, dans tous les sérums étudiés la soustraction enzymatique de la lécithine entraine ou augmente la turbidité. Ils attribuent l'effet stabilisant de ce phospholipide sur les lipides hydrophobes à la perte du groupement hydrophile "lécithine".

Normalement dans la cellule, les graisses, invisibles, sont très finement dispersées. La capacité du protoplasme à maintenir les triglycérides neutres dans cet état de dispersion dépend probablement de la présence d'électrolytes colloïdaux, d'agents à pouvoir émulsionnant : tels les phospholipides. Ces agents ont un petit groupement ionisé ou polaire, ayant une grande affinité pour l'eau et un gros groupement non ionisé, sans affinité pour l'eau. Les phospholipides sont présents dans toutes les cellules et présentent une telle figure.

DIXON en 1958, a précisé que l'existence des structures en micelles laminaires permettait aux molécules de graisses insolubles dans l'eau, de s'y maintenir en émulsion stable. Les feuillets laminaires s'orientent parallèlement les uns aux autres. Les doubles rangées de molécules de lipides sont orientées en couches parallèles avec leur extrémité non polaire à l'intérieur, donc séparée de l'eau, et leur extrémité polaire au contact de l'eau. Il est probable que la molécule de graisse soit enfermée dans des micelles de phospholipides sphériques cylindriques, laminaires, de telle sorte que la graisse ne soit pas au contact direct de l'eau. Il définit ainsi la graisse micellaire invisible.

Mais la graisse peut être sous forme d'agrégats sphériques de graisse liquide recouverts d'un film unimoléculaire de phospholipides : c'est la graisse globulaire visible. Il existe un équilibre entre ces deux formes de graisses et dans cet équilibre interviennent les phospho-

lipides, le cholestérol et les protéines.
En effet, si les phospholipides sont en quantité importante, les micelles sont laminaires et inversement.

	cholestérol	
graisse micellaire invisible		graisse globulaire visible
	phospholipides protéines	

Le cholestérol semble agir inversement aux phospholipides. La graisse micellaire stabilisée par les phospholipides en formant peut être une lipoprotéine complexe, peut être aussi une forme de transport pour la graisse qui quitte la cellule. De plus DIXON a étudié le dépôt des graisses intra-cellulaires. Ce dépôt dépend de la transformation de graisse micellaire en graisse globulaire. Ce dépôt survient donc pour un conflit dans le phénomène de dispersion et augmente ensuite par accumulation de graisse en excès. Cela peut se produire par entrée excessive de graisse dans la cellule ou par défaut d'utilisation. Un facteur qui conduit à la fois à un défaut en graisse micellaire et à un défaut d'utilisation des graisses, est une carence en phospholipides.
Cependant dans la plaque d'athérome existe à sa partie profonde (intima), une accumulation de phospholipides, en particulier au stade précoce. (ASBON 1963 et HENDERSON 1956).

Pour ADAMS, il s'agit d'une synthèse endogène : dans l'aorte humaine athérosclérotique les phospholipides semblent synthétisés par le vaisseau lui même, à l'inverse de ce qui se passe pour le cholestérol. Ces idées reposent sur plusieurs constatations : le fait que le constituant principal, la sphingomyéline soit prédominante, ce qui n'est pas le cas dans le plasma. De même il a été montré que le diagramme des acides gras phospholipidiques est différent dans la plaque athéromateuse et dans le plasma. Certains enzymes et certaines voies métaboliques impliqués dans la synthèse des phospholipides ont été identifiés dans les homogénats d'aorte. Par conséquent, un des rôles du phospholipide dans l'athérosclérose serait un rôle protecteur en facilitant le transport des lipides à tension superficielle élevée (cholestérol et triglycéride), en les solubilisant et en les mettant en suspension sous forme de micelles ou de lipoprotéines dans le plasma ou le liquide tissulaire. Ainsi transport et métabolisation des lipides seraient favorisés et leur accumulation tissulaire serait inhibée.

ETUDE DU RAPPORT $\frac{\text{CHOLESTEROL}}{\text{PHOSPHOLIPIDES}}$

DANS LES DIFFERENTS TYPES D' HYPERLIDEMIES

Plusieurs travaux antérieurs se sont intéressés à cette étude.

On peut, entre autres, souligner les constatations de GERTLER, GARN, LERMAN et MORISSON.

Ils constatent :

- une augmentation du cholestérol (surtout du cholestérol estérifié) pour le groupe étudié de malades atteints de maladie coronarienne.
- une augmentation du rapport : $\frac{\text{cholestérol}}{\text{phospholipides}}$ chez ce même groupe.

KANNEL et coll. n'ont pas, semble-t-il, retrouvé ces résultats chez l'homme.

En effet, de nombreuses expérimentations antérieures chez l'animal avaient bien montré qu'une grande concentration en cholestérol, non accompagnée d'augmentation correspondante des phospholipides, était beaucoup plus apte à entraîner un dépôt de cholestérol dans l'intima des vaisseaux et, par là, à engendrer l'athérosclérose. Cependant, ces résultats sont très critiqués par les auteurs ; critiques portant en particulier sur les conditions expérimentales de ces études qui étaient très éloignées des conditions physiologiques.

Par contre, une étude statistique faite chez l'homme semble prouver que la valeur propre du taux des

phospholipides pourrait avoir une grande importance sur l'athérogénèse.

Leurs conclusions étaient les suivantes :

La distribution du cholestérol et des phospholipides chez les patients qui vont développer des maladies coronariennes, est distinctement et significativement différente de celle des personnes indemnes de la maladie après 16 ans. Cependant, le rapport $\frac{\text{cholestérol}}{\text{phospholipides}}$ dans les deux groupes étudiés (le groupe des sujets indemnes de toute athérosclérose au bout de 16 ans, et celui des sujets qui contracteront une athérosclérose), ne peut les distinguer l'un de l'autre.

Au total, ces auteurs ne retrouvent pas de corrélation entre le risque de la maladie coronarienne et le rapport $\frac{\text{cholestérol}}{\text{phospholipides}}$.

Pour notre part, nous avons mesuré la valeur du rapport $\frac{\text{cholestérol}}{\text{phospholipides}}$ dans différents types d'hyperlipidémies (les plus fréquentes).

CLASSIFICATION DES HYPERLIPIDEMIES

Depuis FREDERICKSON les hyperlipidémies sont classées en 5 types.

TYPE I

Ce type se caractérise par une présence de chylomicrons à une forte concentration dans le plasma, alors que le régime alimentaire est normal et après 12 h. de jeûne. Biologiquement on note une hypertriglycéridémie exogène ou induite par les graisses et une lipidémie totale largement supérieure à trois fois le taux de cholestérol normal. L'électrophorèse montre une importante tache correspondant aux chylomicrons et une diminution des alpha et beta lipoprotéines.

Cliniquement dans la forme complète, on peut voir : des crises douloureuses, une hépatosplénomégalie, des xanthomes cutanés et éruptifs, une rétinite. Mais c'est une affection rare et touchant surtout l'enfant. Le défaut héréditaire est une déficience de l'activité de la lipose protéinique, empêchant l'hydrolyse des triglycrides. (mode autosomique récessif)

Le traitement repose essentiellement sur une restriction des graisses alimentaires.

TYPE II

Ce type se carectérise par une augmentation de concentration des lipoprotéines de mobilité électrophorétique beta. Sur le plan biologique, il y a une augmentation modérée des lipides totaux (souvent inférieur à : 15g %), le taux des triglycérides est normal ou légèrement augmenté ; mais la cholestérolémie est très élevée, pouvant atteindre 5 à 6g °/oo.

La lipidémie totale est en réglc inférieure au triple de la cholestérolémie et le rapport $\frac{\text{cholestérol}}{\text{triglycérides}}$ est supérieur à 2.

Le sérum est clair.

Cette variété correspondait dans l'ancienne terminologie : à l'hypercholestérolémie essentielle sans xanthomes, ainsi qu'à la xanthomatose tendineuse hypercholestérolémique familiale.

La clinique peut se manifester,d'une part, par des signes cliniques correspondant au dépôt lipidique extravasculaire tel gerontoxon, xanthélesma, xanthome et, d'autre part, par des accidents vasculaires ischémique cérébraux coronariens, périphériques.

La transmission se fait sur le mode autosomique dominant. Le traitement est essentiellement diététique. (régime normocalorique avec consommation limitée de cholestérol et de graisses saturées).

TYPE IV

Il se définit par une surcharge en lipoprotéines de très basse densité migrant en position prébeta à l'électrophorèse. Il s'accompagne d'une hyperlipidémie variable avec surtout une augmentation des triglycérides. La cholestérolémie reste le plus souvent normal, mais peut être augmentée. Le rapport $\frac{\text{excès de triglycérides}}{\text{excès de cholestérol}}$ est supérieur ou égal à 4.

Le type correspondant à une hypertriglycéridémie endogène ou induite par les hydrates de carbone.

Le plasma peut rester clair dans les formes mineures ou être trouble voir lactescent.

Cliniquement on peut retrouver les éléments du syndrome hyperlipidémique : crises douloureuses abdominales, hépatosplénomégalie, gérontoxon, xanthomatose éruptive, associés ou non avec la maladie cardio-vasculaire athéromateuse.

Il s'agit vraisemblablement d'une transmission autosomique dominante.

Le traitement diététique est dans ce cas encore le premier à envisager. Pour les obèses il faut un régime hypocalorique et réduit en hydrates de carbone; on pourra dans certains cas rétissants y adjoindre un agent hypolipémiant.

TYPE V

Ce type associe à la fois une élévation des chylomicrons (comme type I) et en lipomicrons (comme type IV).

C'est une hyperlipidermie exogène et endogène. L'electrophorèse montre une surcharge en chylomicrons et en prebeta lipoprotéines.

Le serum est trouble ou lactescent.

Cliniquement on retrouve tous les éléments du syndrome hyperlipidémique et avec une plus grande fréquence : obésité, diabète et tolérance anormale au glucose. Mais c'est une maladie très rare.

Là encore, le traitement est diététique : régime globalement restrictif.

TYPE III

C'est volontairement que ce type a été placé en dernier, car il fait actuellement partie des hyperlipidermiques mixtes.

Il se caractérise par une élévation de la cholestérolémie avec en même temps une augmentation des triglycérides qui est d'ailleurs plus importante. Le rapport $\frac{\text{cholestérol}}{\text{triglycérides}}$ est en règle compris entre 0,5 et 2. Sur le plan électrophorétique on note un excès de lipoprotéines ayant une mobilité beta et une densité anormalement basse.

Le serum est en règle opalescent.

Le syndrome hyperlipidémique manque habituellement sur le plan clinique. Les lésions cutanées rencontrées ont un caractère particulier et on les appelle : "xanthomes tubero-eruptifs". L'association a un accident vasculaire de type ischémique est particulièrement fréquente.

Pour la transmission génétique les différents auteurs ne sont pas en accord.

Du point de vue thérapeutique : le régime est seul efficace, comprenant une restriction glucidique, des graisses en quantité normale (mais comportant pour moitié des graisses insaturées. Cette forme évolue comme un type IV.

Les hyperlipidémies mixtes par double surcharge en lipoprotéines.

Pour FREDERICKSON il s'agit d'une variable du type II.

Pour d'autres auteurs l'existence de ce type biologique distinct est nette. (J. LOEPER)

Sur le plan biologique, comme pour le type III, on note une augmentation du cholestérol et des triglycérides, mais avec une augmentation plus importante pour le cholestérol que pour les triglycérides. L'électrophorèse par contre met en évidence une double surcharge sous forme de deux bandes nettement séparées : beta et prebeta.

Le profil biologique associe les anomalies du type II et du type IV, ce qui a conduit à proposer la dénomination type II + IV.

Là encore la thérapeutique est basée sur le régime, qui ne doit pas être déséquilibré; sinon on note une aggravation de l'hypertriglycéridémie ou de l'hypercholestérolémie selon que la réduction porte sur les

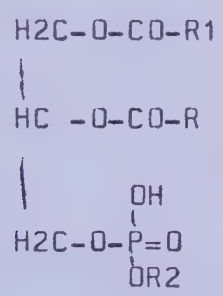
graisses et les sucres. Sous traitement cette forme évolue comme une forme II.

Les formes, qui nous intéressent dans cette étude, sont les formes II, IV et les formes mixtes décomposées en III et II + IV.

METHODE DE DOSAGE DES PHOSPHOLIPIDES

Le dosage des phospholipides a été fait par la méthode colorimétrique de MACHEBOEUF et DELSAL selon la technique de HOH.

Les phospholipides représentent environ 30 % des lipides totaux. Ils sont tous dérivés d'un acide phosphatidique, soit une molécule contenant du glycérol, un acide phosphorique et deux molécules d'acide gras (l'un saturé en règle R1, l'autre insaturé en règle R).
Le terme phosphatidyl désigne le groupement :



Le principe du dosage comprend :

- une extraction des lipides totaux par la méthode de DELSAL
- une minéralisation
- une hydrolyse pour obtenir le phosphore sous la forme orthophosphorique.

- une colorimètrie du phosphore par la méthode ceruleo-molybdique : lorsqu'on ajoute à une solution contenant des ions orthophosphoriques un excès de molybdate et un réducteur (polyphénol + sulfite) il se produit un complexe phosphomolybdeux-molybdique d'une coloration bleue extrêmement intense.

REACTIFS

- Chloroforme R.P. (anesthésique ou non)
- Acide sulfurique concentré R.P.
- Acide nitrique concentré R.P.
- Solution mère étalon de phosphate monopotassique
- Phosphate monopotassique pur sec (B.L.B.) 0.1827 g
- Eau distillée qsp 1000 ml

En effet, on veut une solution étalon à une concentration telle que la coloration finale soit la même qu'un sérum contenant 100 mgr.°/°° de phosphore.

TECHNIQUES

- Extraction des lipides

(Voir dosages de lipides) sur 2 ml de sérum. Après pesée du bécher contenant le résidu de lipides reprendre l'extrait lipidique par :

- $CHCl_3$: 10 ml - Bien dissoudre les lipides à l'aide d'un petit agitateur puis répartir dans 3 tubes jaugés à 6 ml.

- Solution chloroformé : 2,5 ml (équivalent à 0,5 ml de sérum)

On fera ainsi 3 essais par malade.

Evaporer à sec au B.M. bouillant

Laisser refroidir.

- Minéralisation

Ajouter à l'extrait lipidique :

- Acide sulfurique pur concentré R.P. 0,3 ml puis
- Acide nitrique pur concentré R.P. 0,4 ml

Chauffer le tube sur la veilleuse d'un bec Bunsen avec précaution pour éviter les projections. Maintenir le tube en position inclinée à l'aide d'une pince fixée à un support. Chauffer jusqu'à décoloration du liquide de 1 heure à 1 heure x et demi). Surveiller la vitesse de minéralisation au moins toutes les 5 minutes. Il est important de cesser dès que se dégagent des fumées blanches (fumées et non vapeurs).

- Hydrolyse

Après refroidissement, ajouter au produit de la minéralisation :

- Eau distillée qsp 6 ml

Puis plonger le récipient dans l'eau bouillante pendant 15 minutes.

- Colorimétrie

Après refroidissement, compléter si nécessaire au volume de 6 ml, puis ajouter :

- Eau distillée 6 ml (on a ainsi 12 ml de liquide).

Mélanger par retournement, puis prélever 6 ml de solution (correspondant à 0.25 ml de sérum).

Introduire les solutions et les réactifs suivants, en ml (de préférence faire 2 étalons).

	BLANCS	ETALON (0.01827 g°/°°)	DOSAGE
Solution à doser	-	-	6
Solution étalon à 0.01827	-	6	-
Eau distillée	6	-	-
Réactif molybdique	2	2	2
Sulfite de sodium	1	1	1
Hydroquinone	1	1	1

Mélanger par retournement et laisser la coloration se développer pendant 20 minutes.

Le dosage final s'opère sur une quantité de sérum correspondant à 0.25 ml. On a donc :

$\frac{0.100 \times 0.25\ g°/°°}{1000}$ de phosphore dans 0.25 ml de sérum. On veut cette quantité de phosphore sous un volume de 6 ml, soit :

$\frac{0.100 \times 0.25 \times 1000\ g°/°°}{6 \times 1000}$ de phosphore

Or P = 31
O4 = 64
H2 = 2
K = 39
P O4H2 K= 136

Il faudra donc :

$$\frac{136 \times 0.100 \times 0.25 \times 1000}{31 \times 6 \times 1000} = 0.01827 \text{ g°/°°} \text{ de } PO4\ H_2K$$

On fait donc une solution mère à 0.1827 g°/°°.

- Solution diluée de phosphate monopotassique à 0.1827 g°/°°

Diluer au 1/10è : dans une fiole jaugée :

- Solution mère à 0.1827 g°/°°	5 ml	ou	2 ml
- Eau distillée qsp	50 ml		20 ml

Cette solution contient 4.16 gamma de phosphore par ml soit 25 gamma dans 6 ml.

- Réactifs molybdique

Dissoudre d'abord :

- Molybdate d'ammonium pur (B.L.B.)	25 gr
- Eau distillée	300 gr

Ensuite ajouter le mélange refroidi :

- Acide sulfurique concentré	75 ml	(attention :
- Eau distillée	125 ml	l'acide dans l'eau et non l'inverse!)

- Solution de sulfite de sodium à 20 %

- Sulfite neutre de sodium	20 gr
- Eau distillée qsp	100 ml

(doit être renouvelée très fréquemment)

- Solution d'hydroquinone à 1 %

- Hydroquinone	1 gr

- Eau distillée qsp 100 ml
- Acide sulfurique concentré 1 gtte

(pour ralentir l'oxydation)

A renouveler très fréquemment - Conserver en glacière dans un flacon jaune. La solution doit être incolore.

Lecture

Au petit spectralcolorimètre Lange Filtre vert, GIBSON en grandes cuves, faire le zéro sur l'eau distillée, lire T et autres tubes. Déduire le témoin (30 divisions environ).

Calculs

La solution étalon correspondant à la concentration de 100 mg °/°°.

1 ml = 0,000004167 gramme de P.

Soit D la densité optique donnée

par le malade 1 ml = 4,167 gramme de P.

Soit D' la densité optique donnée

par l'étalon 6 ml = 25 gammas

On a phosphore en g°/°°

$$\frac{0,100 \times D}{D'} \quad \left(\text{car } \frac{0,000025 \times 1000 \times M}{0,25 \times Et.} = 0,1 \times \frac{d.\ opt.\ Mal.}{d.\ opt.\ Et.}\right)$$

Pour exprimer les résultats en phospholipides il faut multiplier le phosphore trouvé par 25 donc :

$$\text{Phospholi. en G°/°°} = \frac{D \times 2,5}{D'}$$

Rq. Ou appliquer la formule : (10 en général)

$$\text{gr°/°° de P} = \frac{\text{D opt.Mal. x ml reprise } CHCl_3 \times 2 \times 0,000025 \times 1000}{\text{D opt. Et. x ml sérum x ml reprise sol.chloroformique}}$$

(2 en gl) (2,5 en général)

$$\text{g°/°° de P} = 0,050 \times \frac{\text{D opt. Ma. x ml reprise de } CHCl_3}{\text{D opt. Et. x ml sérum x ml sol.Chlorof}}$$

En effet :

Lécithines = CH_2O - Acide stéarique (généralement) sphyngomyélines: P M 787 environ

CHO - Acide oléique (généralement)

CH_2O - Acide phosphorique - Choline

P.M. = 788

Donc, pour 1 g de phosphore, on a environ 25 g de phospholipides.

Résultats

- Chiffres normaux selon JAYLE 80 ± 20 ml de phosphore / litre ou 2 g°/°° ± 0.50 en phospholipides.

- Rapport $\frac{\text{cholestérol}}{\text{phospholipides}}$ / 1.2

R E S U L T A T S

L'étude a porté sur 250 sujets répartis de la façon suivante :

- normaux 106 cas
- type II 68 cas
- type II et IV 27 cas
- type III 21 cas
- type IV 28 cas.

Les résultats obtenus sont représentés sur deux tableaux :

- Le premier tableau montre les valeurs obtenues pour le dosage des phospholipides, du cholestérol, des triglycérides (moyenne et intervalles de confiance).
- Le deuxième tableau montre la valeur du rapport $\frac{\text{cholestérol}}{\text{phospholipides}}$ (moyenne et intervalles de confiance).

TABLEAU I

Moyennes et intervalles de confiance des valeurs.

	cholestérol	phospholipides	triglycérides
N x 106 cas	2,11 ± 0,07	1,75 ± 0,08	1,00 ± 0,06
Type II 68 cas	3,52 ± 0,22	2,46 ± 0,16	1,05 ± 0,07
Type II + IV 27 cas	3,20 ± 0,30	2,40 ± 0,34	2,05 ± 0,32
Type III 21 cas	3,37 ± 0,26	2,70 ± 0,29	3,23 ± 0,81
Type IV 28 cas	2,87 ± 0,36	2,56 ± 0,42	5,79 ± 2,48

TABLEAU II

Moyenne des rapports $\frac{\text{cholestérol}}{\text{phospholipides}}$

Normaux 106 cas	1,24 ± 0,04
Type II 68 cas	1,46 ± 0,08
Type II + IV 27 cas	1,41 ± 0,13
Type III 21 cas	1,29 ± 0,14

Pour le type II, on note une nette augmentation du rapport $\frac{\text{cholestérol}}{\text{phospholipides}}$ à 1,46; sur le plan statistique ce rapport est significativement différent du rapport du témoin et du type IV.

Pour le type II + IV, l'augmentation est également importante : 1,41. Statistiquement ce rapport est significativement différent du témoin et du type IV.

Pour les types III et IV dont les valeurs sont 1,29 et 1,16, la différence avec les sujets normaux n'est pas suffisamment grande pour être statistiquement valable.

On voit donc qu'un rapport élevé prend une valeur diagnostique, en classant ce sujet dans un type II ou II + IV et non dans un autre type.

Mais l'intérêt pronostic existe aussi. En effet, les formes II et II + IV qui ont un rapport élevé et voisin, ont aussi un pronostic plus sévère; le risque d'accident vasculaire chez des sujets jeunes atteints d'hypercholestérolémie se situant entre 30 et 50 %. Pour les formes III et IV, qui ont un rapport plus bas, leur pronostic est moins sévère, le risque d'accident vasculaire chez des sujets jeunes atteints d'hypertriglycéridémie se situant entre 15 et 30 %.

La valeur du rapport : $\frac{\text{cholestérol}}{\text{phospholipides}}$ a donc un intérêt diagnostique et pronostique; une augmentation de ce rapport est le reflet d'un mauvais pronostic. L'athérosclérose sévère est marquée aussi par une augmentation de ce rapport.

ETUDE DE LA REPARTITION DES PHOSPHOLIPIDES CHEZ LES MALADES ATTEINTS D'HYPERLIPIDEMIES

-:-:-:-:-:-:-:-:-

Le rapport : $\frac{\text{cholestérol}}{\text{phospholipides}}$ ayant un intérêt diagnostique et pronostique, on s'est proposé de pousser plus loin l'étude des phospholipides afin de savoir si leur répartition pourrait avoir un intérêt.

Nous avons vu que pour KANNEL et coll. le taux des phospholipides avait une certaine importance sur la formation de l'athérome.

Ces auteurs soulignent également sans apporter de preuve la possibilité pour l'un ou l'autre des composants du groupe complexe des phospholipides d'avoir une importance prépondérante.

KUNZ et STUMMVOLL ont trouvé un pourcentage élevé de phosphatidyléthanolamine de façon significative dans le plasma de patients ayant des atteintes artérielles périphériques ischémiques en comparaison avec des sujets sains et des hypercholestérolémiques en bonne santé. De même, par comparaison aves les sujets normaux, le taux des sérines et lécithines a été trouvé augmenté chez ces mêmes patients. La signification de leurs données obtenues est discutée avec une attention particulière aux propriétés thromboplastiques et d'aggrégation plaquettaire de la phosphoéthanolamine, de la phosphatidylsenine et des acides gras libres.

Des proportions élevées phosphatidyléthanolamine se sont trouvées plus étroitement liées à l'existence d'atteinte artérielle périphérique occlusive que les autres constituants lipidiques et phospholipides plasmatiques.

La séparation des différents éléments repose sur le principe suivant : l'ultracentrifugation. Il a été fait une ultracentrifugation sur chaque type d'hyperlipidémie.

Par ultracentrifugation à 100 G les différentes lipoprotéines se répartissent comme suit :

- dans le fond du tube : les α et une partie des β lipoprotéines (en particulier les lourdes),

- dans la zone moyenne : la majeure partie des β lipoprotéines,

- dans le surnageant les pré β lipoprotéines et les chylomicrons de densité < 1006.

La mise en évidence se fait ensuite par chromatographie sur silice et coloration à l'iode. Ainsi, on peut distinguer lécithines, céphalines, lysolécithines (appartenant au groupe des glucidophospholipides) et sphingomyéline (élément appartenant au groupe des sphingolipides).

La chromatographie permet de différencier les différentes formes : en effet, on voit en particulier que les phospholipides sont en quantité moins importante dans les formes II et II + IV (formes dans lesquelles le rapport: $\frac{\text{cholestérol}}{\text{phospholipides}}$ est élevé) que dans les formes III et IV.

On peut même trouver une graduation en allant de la plus faible quantité à la plus importante suivant les formes II, II + IV, III et IV.

Sur le plan qualitatif, nous ne chercherons pas à dire qu'il existe des différences ; car on retrouve dans chaque type : lysolécithine, sphingomyéline, lécithine et céphaline.

C O M M E N T A I R E S

La majeure partie du cholestérol est fixée au niveau des beta-lipoprotéines, alors que les phospholipides se retrouvent au niveau des alpha lipoprotéines.

Or on retrouve dans les formes II et II + IV les beta-lipoprotéines comme fraction la plus augmentée.

Ces beta-lipoprotéines comportent 45 % de cholestérol et 22 % de phospholipides; ceci correspond à ce que l'on sait en biologie puisque le cholestérol est augmenté dans ces deux formes beaucoup plus d'ailleurs dans la forme II pour laquelle on a une bande large de beta-lipoprotéines.

Dans les formes III et IV on trouve une bande pre-beta avec une teneur de 15 % en cholestérol et de 15 % en phospholipides. Ceci correspond bien avec la valeur du rapport $\frac{\text{cholestérol}}{\text{phospholipides}}$ qui a été retrouvée dans la première partie.

En effet ce rapport est augmenté dans les formes II et II + IV. C'est là que l'on retrouve une quantité importante de béta-lipoprotéines.

On peut résumer par le tableau suivant.

	cholestérol / phospholipides	cholestérol	lipoprotéines en électrophorèse sur papier
type II	↗	↗↗↗	β↑↑↑ pre β ± ↑
type II + IV	↗	↗↗	β↑ pre β↑
type III	→	↗	"broad β" pre β ±
type IV	→	→	pre β↑↑↑

La chromatographie après ultra-centrifugation donne des résultats correspondant à ce que l'on sait sur la densité des lipoprotéines.

	Densité 1006	Chromatographie surnageant	Chromatographie phase intermédiaire + culot
type II	d: 1006-1063 ↑↑↑	+	±
type II + IV	1006-1063 ↑↑	++	+
type III	d < 1006	+++	+++
type IV	d < 1006 ↑	++++	+++

Cette étude confirme nos connaissances antérieures.

Nous avons vu que chaque type était représenté par un aspect chromatographique différent. Cette chromatographie pourrait donc servir d'appoint au diagnostic en matière d'hyperlipidémie; mais cet examen ne peut guère être utilisé de façon courante.

D'autre part, nous avons vu que l'augmentation de la teneur relative en phospholipides du sérum parait être un élément favorable du pronostic.

Certains auteurs se sont demandés si l'administration de phospholipides ne pourrait pas modifier la biologie et l'évolutivité de l'athérosclérose.

STEINER et DOMANSKI ont enregistré une diminution du cholestérol en administrant de la lécithine de soja.

Pour MONTANARI et Coll. une nette diminution du cholestérol est retrouvée après un long traitement.

Pour PUPITA après 12 mois de traitement, toutes les valeurs des lipides sanguins (lipides, cholestérol, phospholipides) sont améliorées; il note parallèlement une efficacité clinique.

Par contre, les travaux de Mr. et Melle J.LOEPER n'ont pas montré chez l'homme de diminution franche de cholestérol après trois semaines de traitement. Ils ont, par contre, retrouvé un pouvoir cholestérolytique du sérum augmenté. Chez le lapin, trois mois de traitement par la lécithine (0,50 g. de cholestérol par jour étant parallèlement donné) ont entrainé une diminution du cholestérol et

des lipides dans six cas sur huit. Dans les mêmes proportions, une diminution des béta-lipoprotéines avec élévation des gamma - lipoprotéines a été observée.

Histologiquement, il a été vérifié que l'athérome existe cependant mais avec une surcharge cholestérolique diminuée (ce fait a été constaté au cours d'un traitement administré per os).

Ce fait permet de poser une question : la diminution du cholestérol est-elle nécessaire pour traduire l'action des phospholipides sur la mobilisation des lipides ? En fait, le mode d'action des phospholipides sur la mobilisation des lipides n'est pas formellement établi.

C O N C L U S I O N

Le dosage des phospholipides dans les hyperlipidémies présente donc un double intérêt :

- Un intérêt diagnostic :

En effet, une augmentation du rapport $\frac{\text{cholestérol}}{\text{phospholipides}}$ au dessus de 1,40 est en faveur des formes II et II + IV. Il n'est pas possible de différencier ces deux formes par la seule valeur du rapport.

Un rapport proche de la normale (1,24) est en faveur des formes III et IV.

- Un intérêt pronostic :

Cet intérêt est important à considérer. On sait, en effet, que le pronostic des formes II et II + IV est plus sévère que le pronostic des formes III et IV : ce qui parait confirmer l'opinion classique, qu'un rapport élevé est en faveur d'une athérosclérose sévère.

Ainsi l'on pourrait se demander si les phospholipides n'ont pas un intérêt thérapeutique; les expérimentations et les résultats cliniques n'ont pas encore apporté d'éléments formels.

La chromatographie des phospholipides après séparation par ultra-centrifugation étudiée ici, permet d'apporter un appoint diagnostique certain; chaque type d'hyperlipidémie a sa représentation chromatographique propre. Ce ne peut malheureusement pas être un examen de pratique courante. Mais cette étude chromatographique confirme la classification de FREDERICKSON.

B I B L I O G R A P H I E

1 - ADAMS C.W.M.

Role of lipids of aortie elastic fibres in atherogenesis.

Lancet, 1959, 1, 1075-1076.

2 - AHRENS E.H. and KUNKEL H.G.

The stabilisation of serum lipid emulsions by serum phospholipids.

J. exp. Med., 1949, 90, 409-424.

3 - ATTIAS

Hyperlipidémies mixtes avec surcharge en β et pre β lipoprotéines.

Thèse médicale Paris VI P.S. 1971, 2.

4 - DIXON K.C.

Fatty deposition : a disorder of the cell.

Quant. J. exp. physiol., 1958, 43, 139-159.

5 - GERTLER M.M., GARN S.M. and LERMAN J.

The interrelationships of serum cholesterol, cholesterol esters and phospholipids in health and in coronary artery disease.

Circulation, 1950, 2, 205-214.

6 - HOH R.
Dosage des phospholipides, méthode colorimétrique de MACHEBOEUF et DELSAL, technique de HOH.
Pharm. Biol., 1961, 20.

7 - KANNEL W.B., GARCIA M.J., Mc NAMARA P.M. and PEARSON B.
Serum lipid precursors of coronary heart disease.
Human lath., 1971, 2, 129-151.

8 - LEDERER E.
Cours de biochimie, Lipides 1970, 96-116.

9 - LOEPER J. et Melle LOEPER J.
Utilisation de la lécithine dans la prévention de l'athérome artériel.
Thérapie, 1955, 10, 554-558.

10 - LOEPER J., TRICOT R., Melle LOEPER J., ROUFFY J.
Valeur du lipidogramme (technique de Lees et Hatch) joint au dosage des fractions lipidiques du serum pour le dépistage et la classification des hyperprotéinémies.
Presse med., 1969, 77, n° 5, 171.

11 - LOEPER J., ROUFFY J., Melle LOEPER J. et BEUNAICHE M.
Intérêt du dosage des phospholipides dans les différents types d'hyperlipidémie.
Ann. Med. interne, janvier 1973, 124, n° 1, 23-26.

12 - MACHEBOEUF M.
Recherches sur les lipides, les sterols du plasma sanguin.
Lavel, imp. BUNEAUD, 1928, 98.

13 - MONTANARI M., DIOGLIG L.,e CURRI S.B.
Rapporti tra fosfolipidi e colesterolo.
Minerva med., 1966, 57, 3911-3917.

14 - MORRISSON L.M.
The serum phospholipidcholesterol ratio as a test for coronary atherosclerosis.
J. Lab. clin. Med., 1952, 39, 550-555.

15 - POLONOVSKI M.
Biochimie médicale 9ème édition,
2, 132-138.

16 - PUPITA F. und GAGNA C.
Therapie der Arteriosklerose mit "essentiellen" Phospholipiden.
Med. Mschr., 1969, 23, 514-515.

17 - STEINER A. and DOMANSKI B.
Effect of foeding of "Soya lecithin" on serum cholesterol level of man.
Pro. Soc. exp. Biol. Med., 1944, 55, 236-238.

Vu, le Président de Thèse

Mr. le Professeur LOEPER

Vu, le Doyen de la Faculté

PITIE - SALPETRIERE

Mr. le Professeur CASTAIGNE

Vu et Permis d'Imprimer

Le Recteur de l'Académie de Paris

R. MALLET